

CERCETĂRI ANATOMO-MORFOLOGICE LA PLANTELE 2n, 3n ȘI 4n DE CITRULLUS VULGARIS SCHRAD.

ION ANGHEL

Tratind diferite plante diploide cu 0,2 și 0,4% colchicină au rezultat schimbări morfologice însemnate la un număr de plante de pepene verde.

Duplicațiunea numărului de chromosomi se reflectă în numărul mai mare de chloroplaste în celulele stomatice, în mărirea stomatelor diametrul granulelor de polen și în micșorarea numărului de stomate observabile în câmpul microscopului.

Formele autotetraploide obținute și discutate în această lucrare, sînt vădit diferite de formele inițiale diploide prin caracterele lor citologice, morfologice și biochimice.

La pepenele verde diploid ($2n = 22$) s-au obținut cu ajutorul colchicinei forme autotetraploide ($2n = 44$), iar din încrucișarea $4n \text{ ♀} \times 2n \text{ ♂}$ au rezultat forme triploide, care au fost deja introduse în cultură în Japonia (H. KIHARA, 1951; M. TANAKA și T. MUKAI, 1955; M. SHIMOTSUMA, 1961—1965), S.U.A. (O. J. EIGSTI, 1955, C. STEVENSON, 1958 și R. WALL, 1960).

Recent studii în acest domeniu au fost inițiate în Ungaria (A. KISS) și Italia (B. BORGHI).

Primele cercetări privind poliploidia la pepenele verde au fost efectuate în țara noastră de P. RAICU și I. ANGHEL 1963, concretizate prin obținerea a 5 linii autotetraploide și mai multe combinații triploide, cît și studiul lor citogenetic.

Material și metode

În acest studiu am folosit liniile autotetraploide *Arad*, *Brăila*, *Graybelle*, *Kleckley sweet*, *Tîmburești*, obținute în laboratorul nostru prin tratamente cu colchicină și 4 combinații triploide: *Arad* $4n \text{ ♀} \times$

Brăila 2n ♂; *Brăila* 4n ♀ × *Graybelle* 2n ♂; *Brăila* 4n ♀ × *Kleckley* 2n ♂; *Graybelle* 4n ♀ × *Graybelle* 2n ♂.

Pentru numărarea cloroplastelor în stomate și în celulele epidermei, cât și pentru determinarea mărimii și frecvenței stomatelor, s-a folosit metoda colorării cu o soluție de iod în iodura de potasiu. Ținând seama de faptul că numărul de cloroplaste, mărimea și frecvența stomatelor, variază destul de mult pe suprafața aceleiași frunze, în funcție de vârsta și locul de diferențiere pe plantă; s-a folosit o porțiune din epiderma inferioară, din aceeași regiune la toate variantele 2n, 3n și 4n și pe cât posibil aceste determinări s-au efectuat în aceeași perioadă a fiecărui an (1963—1968).

Calculul raportului nucleu-citoplasmă (N/P) a fost efectuat după formula :

$$NP = \frac{V_n}{V_c - V_n} \quad \text{în care: } \begin{array}{l} V_n = \text{volumul nucleului} \\ V_c = \text{volumul celulei} \end{array}$$

Pentru aceasta s-a măsurat diametrul celulelor și al nucleilor din țesutul meristematic al rădăcinilor embrionare. Rădăcinile au fost fixate în *alcool-acid acetic glacial* (3:1) timp de 3 ore, hidrolizate în acid clorhidric normal la 60°C, timp de 10 minute și colorate cu reactivul Schiff.

Rezultate și discuții

Studiul comparativ al plantelor 2n, 3n și 4n efectuat în perioada 1963—1968 demonstrează că datorită dublării numărului de cromozomi plantele autotetraploide și cele triploide, rezultate din încrucișarea 4n ♀ × 2n ♂ prezintă o creștere în mărime a nucleului și celulei, manifestată prin fenomene caracteristice de gigantism. Cercetările noastre au fost efectuate la 3 linii diploide, la corespondenții lor autotetraploizi și la 10 combinații triploide (4n × 2n) și au arătat că la plantele 4n are loc o creștere mai accentuată a nucleului, comparativ cu citoplasma. Această creștere se observă în special în primele generații (C₁—C₃), după care dimensiunile rămân relativ constante. Referindu-ne la soiul „*Brăila*“, observăm că diametrul celulei autotetraploide reprezintă o creștere de la 160,35—176,20% față de 100% cât reprezintă diploidul respectiv, în timp ce diametrul nucleului este mult mai mare, comparativ cu al diploidului. Această depășire este cuprinsă între 200,48—270,00%. Volumul celulelor tetraploide depășește de 2—5 ori volumul celor diploide în timp ce volumul nucleilor la plantele tetraploide depășește de 4—9 ori pe cel al plantelor diploide. Raportul nucleu-citoplasmă este de 0,0141 la soiul diploid *Brăila* și de 0,02668—0,0531 la autotetraploidul respectiv. Valoarea relativ redusă a raportului se explică prin dimensiunile relativ mici ale *cromozomilor* acestei specii, care au o influență directă asupra volumului și deci a raportului nucleu-citoplasmă.

Valori apropiate au fost găsite la toate variantele 2n și 4n, studiate. În privința combinațiilor triploide, acestea prezintă valori intermediare formelor diploide și tetraploide (tabelul nr. 1).

RAPORTUL NUCLEO-CITOPLASMATIC LA PLÂNTELE 2n, 3n 4n (1963)

Varianta	Grad polipl.	Nr. celule analizate	Diametrul celulei		Diametrul nucleului		Raportul nucleoplasmatic
			μ	%	μ	%	
Arad	2n	400	27,95 ± 0,21	100,0	6,587 ± 0,51	100	0,0132
	4n	400	43,89 ± 0,38	157,0	12,73 ± 0,29	193,46	0,0249
Brăila	2n	400	26,11 ± 0,17	100,0	6,19 ± 0,23	100	0,0141
	4n	400	41,87 ± 0,29	160,3	12,41 ± 0,32	200,48	0,02669
Graybelle	2n	400	25,24 ± 0,27	100,0	6,42 ± 0,18	100	0,0165
	4n	400	41,65 ± 0,33	164,9	12,77 ± 0,22	198,9	0,0296
A 4n ♀ x B 2n ♂	3n	400	41,5 ± 0,23	148,4	10,77 ± 0,21	162,1	0,0173
B 4n ♀ x A 2n ♂	3n	400	38,6 ± 0,19	147,8	9,87 ± 0,21	159,4	0,0169
G 4n ♀ x G 2n ♂	3n	400	39,8 ± 0,21	157,6	10,02 ± 0,19	161,3	0,0162

NUMĂRUL DE CLOROPLASTE ÎN STOMATE

Varianta	Grad polipl.	Nr. obs. (n)	$\bar{X} \pm sx$	Limitele de variație	Valoarea relativă %	d	Semnificația diferenței *)
Arad	2n	2500	14,48 ± 0,19	8—27	100	—	—
	4n	2500	26,10 ± 0,22	17—42	180,2	+11,62	xxx
Brăila	2n	2500	12,83 ± 0,21	7—23	100	—	—
	4n	2500	24,72 ± 0,24	13—39	190,2	+11,89	xxx
Graybelle	2n	2500	13,32 ± 0,21	7—23	100	—	—
	4n	2000	28,58 ± 0,26	20—36	223,1	+14,26	xxx
Kleckley sweet	2n	1000	13,97 ± 0,22	9—20	100	—	—
	4n	1000	20,5 ± 0,24	16—26	146,8	+ 6,53	xxx
Tîmburești	2n	1000	11,71 ± 0,16	7—18	100	—	—
	4n	1000	24,81 ± 0,16	15—44	211,9	+13,10	xxx
A 4n ♀ x B 2n ♂	3n	500	21,73 ± 0,22	16—30	142,4	+ 7,76	xxx
B 4n ♀ x G 2n ♂	3n	500	23,06 ± 0,23	17—30	177,2	+10,05	xxx
G 4n ♀ x G 2n ♂	3n	500	24,75 ± 0,29	19—31	215,2	+13,29	xxx

*) Semnificația diferenței la plantele triploide s-a calculat față de genitorul patern, diploid.

NUMĂRUL DE CLOROPLASTE ÎN CELULELE EPIDERMEI

Varianta	Grad polipl.	Nr. obs.	$\bar{X} \pm s_x$	Limitele de variație	Valoarea relativă %	d	Semnificatia diferenței *)
Arad	2n	200	$6,0 \pm 0,3$	2—11	100	—	—
	4n	200	$14,68 \pm 0,20$	10—20	244,66	+8,66	xxx
Brăila	2n	200	$3,52 \pm 0,32$	2—9	100	—	—
	4n	200	$11,03 \pm 0,19$	8—16	313,0	+7,51	xxx
Graybelle	2n	200	$5,25 \pm 0,21$	2—10	100	—	—
	4n	200	$8,64 \pm 0,21$	6—13	164,6	+3,39	xxx
Kleckley sweet	2n	200	$3,89 \pm 0,27$	2—8	100	—	—
	4n	200	$9,21 \pm 0,17$	7—14	237	+5,32	xxx
Tîmburești	2n	200	$5,21 \pm 0,32$	2—11	100	—	—
	4n	200	$13,3 \pm 0,16$	9—18	255	+8,09	xxx
A 4n ♀ x B 2n ♂	3n	200	$9,84 \pm 0,3$	7—15	164,0	+3,84	xxx
B 4n ♀ x K 2n ♂	3n	200	$8,31 \pm 0,32$	6—16	236	+4,79	xxx
G 4n ♀ x G 2n ♂	3n	200	$6,57 \pm 0,3$	3—11	120,5	+1,32	xxx

*) Semnificația diferenței la plantele triploide s-a calculat față de genitorul patern, diploid.

DIMENSIUNEA STOMATELOR ÎN MICRONI

Varianta	Grad polipl.	Nr. obs.	$\bar{X} \pm s_x$	Limitele de variație	Valoarea relativă %	d	Semnificatia diferentei *)
Arad	2n	2500	$24,36 \pm 0,26$	19—32,5	100	—	—
	4n	2500	$34,0 \pm 0,25$	27—40	139,6	+ 9,63	xxx
Brăila	2n	2500	$24,5 \pm 0,23$	17—32	100	—	—
	4n	2500	$34,16 \pm 0,26$	26—42	139,0	+ 9,66	xxx
Graybelle	2n	2000	$24,5 \pm 0,26$	15—30	100	—	—
	4n	2000	$35,50 \pm 0,25$	25—40	145,1	+11,06	xxx
Kleckley sweet	2n	1000	$19,01 \pm 0,24$	15,7—26,7	100	—	—
	4n	1000	$30,93 \pm 0,26$	22,5—40	162,1	+ 1,92	xxx
Tîmburești	2n	1500	$26,45 \pm 0,28$	18—32	100	—	—
	4n	1500	$37,71 \pm 0,23$	30—44	142,5	+11,26	xxx
A4n ♀ x B2n ♂	3n	500	$33,1 \pm 0,20$	28—39	134,3	± 8,2	xxx
B4n ♀ x G2n ♂	3n	500	$31,6 \pm 0,22$	36—39	130	+ 7,3	xxx
G4n ♀ x G2n ♂	3n	500	$32,1 \pm 0,17$	36—40	128,9	+ 7,2	xxx

*) Semnificatia diferentei la plantele triploide s-a calculat față de genitorul patern, diploid.

FRECVENȚA STOMATELOR ÎN CÎMPUL MICROSCOPIC *)

Varianta	Grad polipl.	Nr. obs.	$\bar{X} \pm s_x$	Limitele de variație	Valoarea relativă %	d	Semnificația diferenței
Arad	2n	1000	$32,86 \pm 0,23$	20—41	100	—	—
	4n	1000	$12,26 \pm 0,24$	6—19	37,3	—20,59	000
Brăila	2n	1000	$23,36 \pm 0,33$	15—33	100	—	—
	4n	1000	$12,78 \pm 0,32$	8—17	54,7	—10,58	000
Graybelle	2n	800	$26,82 \pm 0,26$	18—36	100	—	—
	4n	800	$13,1 \pm 0,22$	9—16	48,8	—13,72	000
Kleckley sweet	2n	600	$19,56 \pm 0,26$	15—30	100	—	—
	4n	600	$12,7 \pm 0,25$	9—16	66,2	— 6,46	000
Timburești	2n	600	$19,3 \pm 0,22$	15—31	100	—	—
	4n	600	$9,97 \pm 0,24$	10—17	51,6	— 9,33	000
A4n ♀ x B2n ♂	3n	200	$14,4 \pm 0,27$	12—26	40,9	—18,31	000
B4n ♀ x G2n ♂	3n	200	$17,9 \pm 0,30$	14—29	72,9	— 6,7	000
G4n ♀ x G2n ♂	3n	200	$17,4 \pm 0,19$	13—30	63,8	— 9,84	000

*) Microscop IOR ob. 10, oc. 10 x.

Mărirea celulelor plantelor poliploide determină modificarea tuturor caracterelor morfologice (macro- și microscopice), biochimice și fiziologice.

Astfel, datorită corelației care există între gradul de poliploidie și caracterele morfo-fiziologice, se constată o creștere a numărului de cloroplaste în stomate, proporțional cu gradul de ploidie (Fig. 1). Acest lucru se constată la toate variantele studiate și în toți anii. În cifre relative depășirea variază între 160,3 (linia *Kleckley sweet*) și 238,2% (linia autotetraploidă *Brăila*) și între 142,4—215,2% la formele triploide (tabelul nr. 2).

În privința diferențelor între media numărului de cloroplaste la formele $2n$ și cele $3n$ și $4n$, toate sînt foarte semnificative ($t > 3,29$).

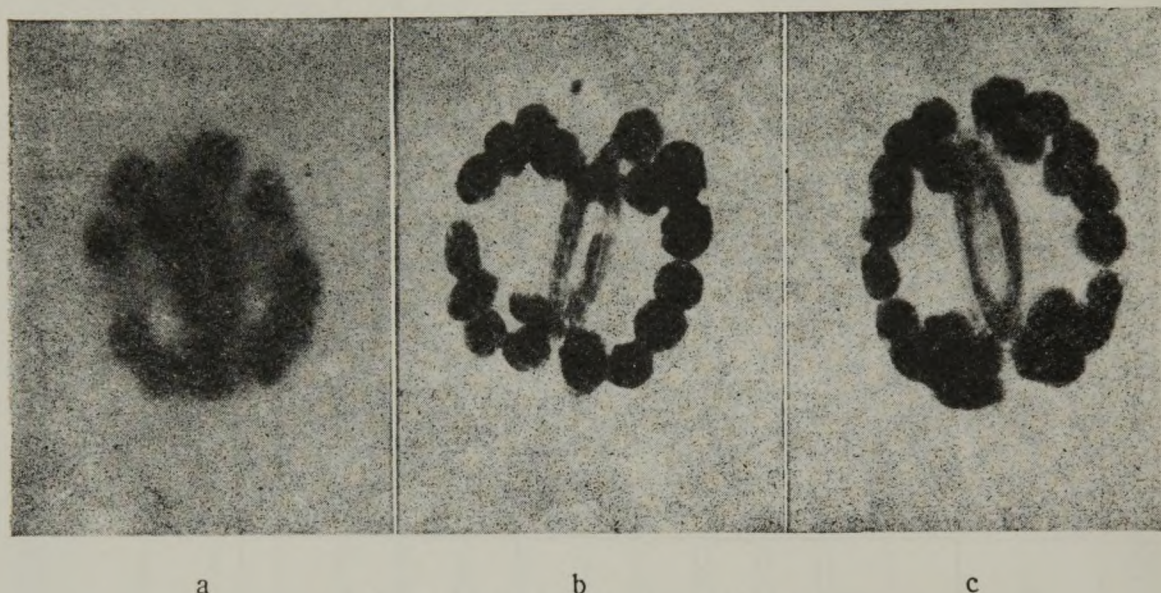


Fig. 1. Cloroplaste în stomate :
a) diploide, b) triploide, c) tetraploide

Analizînd în ansamblu aceste rezultate se poate observa că la toate soiurile și combinațiile diferențele între mediile numărului de cloroplaste în stomate la liniile $2n$, comparativ cu cele $4n$ și $3n$, sînt foarte semnificative.

O creștere asemănătoare a numărului de cloroplaste se întîlnește și în celulele epidermei și ale țesutului palisadic (tabelul nr. 3).

La toate soiurile și combinațiile studiate, dimensiunile stomatelor în microni, este considerabil mai mare la tetraploizi și triploizi, comparativ cu formele diploide. În valori relative depășirea variază între 128,5—167,6% la formele autotetraploide și între 125—134% la triploizi. Diferențele între mediile la formele $2n$ și cele $3n$ și $4n$ sînt foarte semnificative ($t > 3,29$) (tabelul nr. 4).

Din cauză că celulele și respectiv stomatele plantelor poliploide au dimensiuni superioare diploizilor (tabelul nr. 1 și 4) frecvența stomatelor la formele $4n$ și $3n$ în cîmpul microscopic este mai mică decît la cele $2n$.

Cercetările noastre au arătat că valorile relative ale frecvenței stomatelor la poliploizi nu reprezintă decît 36,1 în cazul autotetraploidului

Arad și între 40,9—76,2% la triploizi, din valorile diploizilor (100%). Diferențele între mediile calculate matematic sînt foarte semnificative în toate cazurile ($t > 3,29$). Un alt fenomen foarte evident la poliploizi este amplitudinea mică de variație a frecvenței stomatelor, comparativ cu plantele diploide (Fig. 2).

Studiul comparativ efectuat în perioada anilor 1963—1968 la 20 variante $2n$, $3n$ și $4n$ și prezentat mai înainte, arată existența unei strînse corelații între numărul de garnituri de cromozomi și anumite caractere microscopice cum sînt: numărul de cloroplaste în stomate, dimensiunea și frecvența stomatelor, mărimea polenului și numărul de pori germinativi. Din tabelele 1—5 se poate constata că diferențele între mediile de la plantele diploide și poliploide ($4n$ și $3n$) sînt în toate cazurile foarte semnificative ($t > 3,29$). De asemenea se poate observa că aceste caractere sînt relativ constante pentru fiecare variantă și variază în limite foarte restrînse de la un an la altul.

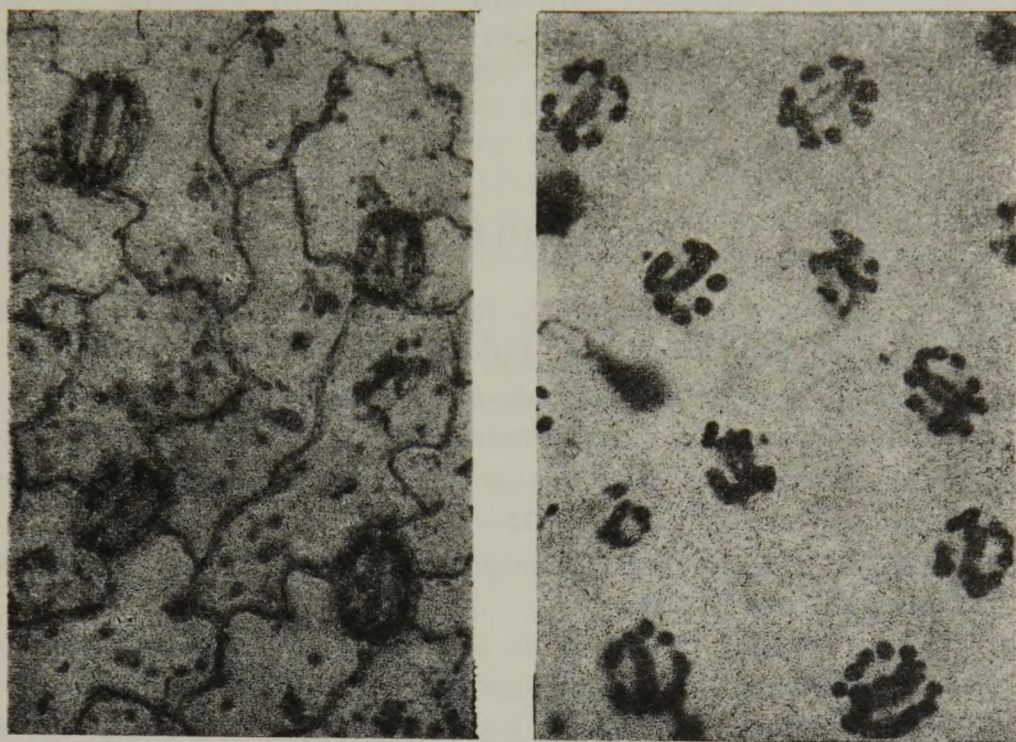


Fig. 2. Frecvența (densitatea) stomatelor în cîmpul microscopului :
 stînga — plantă diploidă
 dreapta — plantă tetraploidă.

Rezultatele obținute de noi sînt similare cu cele citate în literatura de specialitate privind poliploidia la alte specii J. MARGARA și H. TOUVIN (1958) la *Beta vulgaris*, S. ESSAD și H. TOUVIN (1959) la *Beta vulgaris*; P. LELAKIS (1957), G. MOCHIZUKI și N. SUEOKA (1955), T. BUTTERFASS (1960) la *Vitis vinifera*; R. DE VILMORIN și R. CHOPINET (1952) la *Capsicum annum*; P. RAICU ȘI COLABORATORII (1966) la *Ageratum mexicanum*, *Antirrhinum majus*, *Beta vulgaris*, *Capsicum annum*, *Citrullus vulgaris*, *Matthiola annua*, *M. incana*, *Raphanus sativus*, *Secale cereale*, *Trifolium pratense*. Menționăm

că studiile noastre completează cercetările efectuate, aducînd date originale la această specie, nestudiată din acest punct de vedere pînă în prezent.

Concluzii

Studiile unor caractere anatomo-morfologice microscopice ne permit evidențierea următoarelor concluzii :

1. Există o deplină concordanță între gradul de poliploidie și anumite caractere anatomo-morfologice, microscopice : numărul de cloroplaste în stomate și în celulele epidermice, mărimea și frecvența stomatelor în cîmpul microscopului, raportul nucleo-plasmatic.

2. Diferențele existente între mediile liniilor diploide și cele $3n$ și $4n$, în privința unor caractere anatomo-morfologice microscopice, se folosesc pentru evidențierea gradului de poliploidie.

3. Liniile autotetraploide, obținute de noi și studiate în perioada anilor 1963—1968, prezintă caractere citologice, anatomo-morfologice, fiziologice și biochimice deosebite față de cele ale plantelor diploide inițiale.

BIBLIOGRAFIE

1. ANGHEL, I., *Cercetări comparative la formele $2n$, $3n$, $4n$ de *Citrullus vulgaris*. Cercetări de genetică II. Ed. Didactică și Pedagogică, 1969.*
2. ANGHEL, I., *Noi forme autotetraploide de *Citrullus vulgaris* induse cu ajutorul colchicinei*. Comunicări de Botanică S.S.B., vol. XI, 1969.
3. ANGHEL, I., *Stravnitelnîe issledovania form $2n$, $3n$, $4n$, *Citrullus vulgaris**. Ghenetika, tom. V, nr. 6, p. 32—40, 1969.
4. BUTTERFASS, T., *Ploidie und Chloroplastenzahlen*. *Berichte d. Deutsch. Bot. Gesellschaft*, nr. 10, 1960.
5. ESSAD, S., TOUVIN, H., *Technique de production et de contrôle des betteraves polyploides*. *Annales de l'Amélioration des Plantes*, no. 4, 1959.
6. KIHARA, H., *Triploid watermelons*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, nr. 58, 1951.
7. LELAKIS, P., *Induction de la polyploidie chez *Vitis vinifera* L. par application de la colchicine*. *Annales de l'École Nationale d'Agriculture de Montpellier* XXX, no. 1—2, 1957.
8. MARGARA, J., TOUVIN, H., *La polyploidie chez la betterave sucière*. *C. R. Acad. Agric.*, nr. 44, 1958.
9. MOCHIZUKI, A., SUEOKA, N., *Genetic studies on the number of plastids in stomata. Effects of autopolyploidy in sugar beets*. *Cytologia*, nr. 20, 1955.
10. RAICU, P., *Metode noi în genetică*. Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1962.
11. RAICU, P. și colab., *Contribuții la studiul metodei indirecte de identificare a plantelor poliploide*. *An Univ. București, Seria Șt. Naturale-Biologie*, anul XIV, p. 41—51, 1965.
12. RAICU, P., ANGHEL, I., *Două linii noi autotetraploide de pepene verde*. *Grădina, via și livada*, nr. 10, p. 24—31, 1966.

13. SHIMOTSUMA, M., *A survey of seedless watermelon breeding in Japan*. Seiken Zihô, nr. 12, 1961.
14. STEVENSON, E. C., *Seedless watermelons Anes*. Vegetable Grawer nr. 6, 11, 1958.
15. TANAKA, M., MUKAI, T., *Studies on artificial polyploid melons*. Seiken Sihô, nr. 7, 1955.
16. VILMORIN, R., CHOPINET, R., *Contribution à l'étude des nombres chromosomiques des races et variétés cultivées chez nos plantes ornementales*. Caryologia (supplements), vol. VI, 1954.

ANATOMICAL AND MORPHOLOGICAL RESEARCHES ON THE $2n$, $3n$
AND $4n$ PLANTS OF CITRULLUS VULGARIS SCHRAD.

Summary

Treating different plants of the diploid sorts, with 0,2 and 0,4 percent aqueous colchicine, resulted an significant morfological changes in a number of watermelon plants, i. e, stem and leaf thickening, a drange, a slower rate of plant growing a flower size alternation etc.

The duplication of the chromosome number results, in a higher number of chloroplasts in the stomata, on increasing of stomata, lenght and polen diameter, a diminuation of the stomata frequency in the microscopic field.

The autotetraploids forms we have obtained and have discussed in this paper are obviolously different from the initial diploid material by their cytological, morfo-physiological and biochemical features.